(54) PREPARATION GLUTATHION

(11) Kokai No. 54-122793 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28008 (22) 3.10.1978

(71) TANABE SEIYAKU K.K. (72) ICHIROU SENHATA(2)

(52) JPC: 36(2)D25 (51) Int. Cl². C12D13/00

PURPOSE: To prepare glutathion in high purity and yield, by the enzymatic reaction in the presence of an addition compound of a soluble polymer carrier with adenosine

5'-triphosphoric acid, and acetylphosphoric aicd.

CONSTITUTION: Adenosine-5':triphosphoric acid (ATP) is converted to an ATP analog by introducing a spacer such as alkylenediamine, aminocarboxylic acid, etc., and bonded to a soluble polymer carrier such as dextrane with covalent bond. L-Glutamic acid, L-cysteine, glycine, and 1.5 times amount, based on the ATP, of acetylphosphoric acid are dissolved in a buffer solution having a pH range of 5~8, and made to react with anf enzyme liquid having glutathion-synthetase activity and acetoxynase activity at 25~50°C. Since the ADP converted from ATP is quantitatively regenerated to the ATP, the reaction proceeds in high efficiency, and the glutathion can be easily separated and recovered

(54) PREPARATION OF L-GLUTAMIC ACID

(11) Kokai No. 54-122794 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28821 (22) 3.14.1978

(71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) RIYOUICHI KATSUMATA(1)

(52) JPC: 36(2)D251

(51) Int. Cl². C12D13/06

PURPOSE: To enable high yield production of L-glutamic acid even in a medium containing excess biotin, by culturing a specific variant induced from L-glutamic acid-producing bacteria belonging to Corynebacterium or Brevibacterium genus.

CONSTITUTION: A lysozyme-sensitive strain such as corynebacterium glutamicum KY9703, KY9705, T339 or T327 (FERM-P No.4412, 4413, 4789, or 4790) induced from Corynebacterium glutamicum ATCC13032, or Brevibacterium flavum KY9733 (FERM-P No.4414) induced from Brevibacterium flavum ATCC14067, is inoculated in a nutrient medium, and aerobically cultured at pH6~9 and 24~37°C. Even if the medium contains excessive biotin, the production of L-glutamic acid is not inhibited, and the L-glutamic acid can be obtained in high yield.

(54) PREPARATION OF COENZYME Q10

(11) Kokai No. 54-122795 (43) 9.22.1979 (19) JP

(21) Appl. No. 53-28603 (22) 3.15.1978

(71) ASAHI KASEI KOGYO K.K. (72) SHINICHI FURUKAWA(2)

(52) JPC: 36(2)D33;36(2)C04

(51) Int. Cl². C12D3/02,C12D13/10

PURPOSE: To produce coenzyme Q_{10} having excellent pharmacological activity such as abatement of cardiac insufficiency, etc., at low cost, by culturing coenzyme Q_{10} -producing bacteria belonging to Brettanomyces genus, and separating the

coenzyme Q₁₀ accumulated in the bacterial cells.

CONSTITUTION: Coenzyme Q₁₀-producing bacteria belonging to Brettanomyces genus, e.g. Brettanomyces anomalus IFO0642, are cultured in a nutrient medium at pH4.5~7.5 and 25~35°C for 1~10 hours under shaking or under aeration and agitation. After culturing, the bacterial cells are collected, and saponified with an alcoholic alkali. The coenzyme Q₁₀ is extracted from the saponified cell with an organic solvent, and factionated and purified by adsorption chromatography or thin-layer chromatography. The coenzyme Q₁₀ is a compound of formula wherein n is 10.

$$H_{3} C C H_{2}$$
 $C H_{3} C C H_{4}$
 $C H_{4} C C H_{5}$
 $C H_{5} C C H_{7} + \frac{1}{n} H_{1}$

(9日本国特許庁(JP)

10 特許出願公開

⑩公開特許公報 (A)

昭54-122794

(1) Int. Cl.²
 C 12 D 13/06

識別記号

砂日本分類 36(2) D 251 庁内整理番号 ❸公開 昭和54年(1979)9月22日

6760-4B

発明の数 2 審査請求 未請求

(全 6 頁)

ᡚし−グルタミン酸の製造法

20特

頭 昭53-28821

22出

頭 昭53(1978)3月14日

⑫発 明 者 勝亦瞭一

相模原市文京 1 -13-8

⑩発 明 者 高山健一郎

厚木市鳶尾1丁目9番10号

切出 願 人 協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町一丁目 6

耳 組

/ 発明の名称

I - グルチミン酸の製造法

2.特許請求の監選

- (1) コリネパタテリウム属またはプレビパタテリウム属に属する数生物を培地に培養してエーグルタミン酸を培地中に審積させ、これを採取する方法にかいて、リゾテームに感受性を有し、培地中に存在するビオテンによつてエーダルタミン酸の生産が抑制されたい菌体を用いることを特徴とするエーグルタミン酸の製造法。
- (2) コリネパタテリウム属またはプレビパクテ リウム属に属し、リンテームに感受性を有し、 通知の 培地中に存在するビオテンによつてエーグル タミン酸の生産が抑制されない性質を有する 電牛物。
- (3) 数数生物がコリネバタテリウム・グルタミ クムまたはプレビバクテリウム・フラブムに

展する関係から選ばれる特許請求の範囲2の の生物

(4) 飲食生物がコリネバタテリウム・ダル&ミ

クム K I タフ の 3 (極工研密託受場番号第

ギギノス、 K R R L / / 2 フ /)。 コリネバ

クテリウム・ダルタミタム K Y タフ の 3 (優 工研密託受地番号第ギギノ3、 M R R L / / 2 フ a)、 かよびプレビバクテリウム・フラ ブム K I タフ 3 3 (優工研密託受超番号第 ギギノザ、 M R R L / / 2 7 3)から退ばれる特許請求の戯出3の Q 生物。

4 発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する食生物を培地に培養してムーグルタミン酸を培地中に審検させ、これを採取する方法において、リゾテームに感受性 通知のを有し、培地中に存在するとメナンによつてムーグルタミン酸の生産が抑制されたい菌体を用いることを特徴とするムーグルタミン酸の製造法に関する。

4字加入

特開昭54-122794(2) 以下本発明をさらに詳細に説明する。

生育にピオチンを要求するルータルタミン酸 生産質のなっグルタミン酸生産性は焙油中のビ オチン書度と極めて密袋な隣係があり、生育に 対して製品量のピオテン機関のときはじめてエ - グルタミン便を生業できる。一方安価を培地 の福原料として利用される展集書数や加水分解 物などはビオチンを多量に含有している。とれ 5祖原科を含有する培地K L - グルチミン酸生 産歯を培養する方法としては特公昭37-16 タン号公報、特公昭38-23288号公報な どに記載されている方法が知られているが、工

本発明者らは、安備な租原料を用い、過剰量

は、過剰のピオチン含有培地を用いても、ビオ ナンによる抑制を受けるととなく高い収率でも - グルタミン酸を生産できることを見出した。

楽的にはさらに使れた方法が望まれている。 のピオナンの作用を回避しても・グルメミン験 を製造する方法につき研究した結果、従来のよ --グルタミン酸生産器を親株として変異酶導し たりンチームに感受性を有する変異様を用いれ

毎限射、放射華原射、変異誘起剤処理等の過常 の方法が用いられる。変異酵導された変異株か らりゾテームに感受性を有する盲株を選択する には、葉株が生育可能な優度のリゾテームを含 有する培地で生育できなくて、リゾチーム無磁 加塔地では霊体と同様に生育できるものを過べ ばよい。従つて、ここでリンテームに感受性で あるとは、リソテームに対する最小阻止機能が 緩徐よりも低いことを意味する。また培地中に 過剰の 存在する人ピオテンによつてL-グルセミン酸の 生意が抑制されないとは、培地中に存在する人と オテンによるL-グルタミン散生産の抑制が実 質的に無視できる温度のものであることを意味 する。具体的には前記のごとき組原料を用いた 海刺の うけるととなくエーのみえン酸の生物が 場合でもだまテンドエる影響を振揚できること を意味する。

本発明に用いる具体的に好道な菌株の一例と しては、コリネバクテリウム・グルタミッム ATCCI3034を選択として得られたコリ キバクテリウム・グルタミクムをエタフロヨ

本発明によればコリネベタテリウム真または プレビバタテリウム属に属し、リゾナームに感 受性を有し、培血中に存在するだ。オテンによつ 3字加入 てムーグルタミン酸の生産が抑制されない性質 を有する最生物を培地に培養すれば培地中にし - グルタミン散が岩積するので、これを採取す るととにより高収率にも一ダルチミン酸が得ら

本発明に用いる数生物はコリネパクテリウム 異またはプレビバクサリウム異に異し、リゾナ 通索の ームに暴受性を有し、培地中に存在するピオナ 3字加入 ンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制され ない性質を有する微生物であればいかをる菌栓 をも用いるととができる。一般にはコリネパク テリクム属さたはプレビバタテリクム異に属し、 L - グルタミン酸生産銀を有する菌体を気体と し、とれを変異質導処理して得られた変異株か らりゾナームに感受性を有するものを選択し、 とれを用いる。安美師導の方法としては、紫外

(像工研寄託受益番号第44/2号、 HRRL / / 47 /)、コリネパタテリウム・グルタミ クム&ミタフのよ(鉄工研容託受避番号第44 ノま号、FRRLノノスクス)かよびプレビバ クテリウム・フラブムATCCI#067を選 株として得られたプレビパクテリウム・フラブ ムエミタク33(做工研客託受選番号第4414 号、FRRL!!ュフォ)がおけられる。

コリネバクテリウム・クルタミクムATCC

1. / 3 032後職株としてリゾナーム感受性変異株 』を取得する方法について以下具体的に説明する。 (極度製薬社業) 放棄株を粉末ブイヨン、208/4かよび酵母エ キスタタ/ & の組成を有する培地(級闘前 pH ^{える、}以下で培地という)に征駕しまのでで扱 重培養する。中期対数期で培養を中止し、集賞 し、生理食塩水で茯香後、 3/20 トリス・マレ ート級情収(PH LO)には×1の4線階/M になるように暴潤する。との最積液に最終過度 3 0 0 △8/≦ になるようにニトロソクアニジン を加え、23℃で30分類放電し、強心分離化

特開昭54-122794(3)

より関体を集め、同一級需要で関体を洗浄後、 生組食塩水に整備し、適宜生理食塩水で着釈し て C 培地にさらに 3 9 / 4 の寒天を含む固体培 地 (以下 C 4 培地という)に塗りつける。これ を 3 0 ℃で 3 日間培養し、生じたコロニー (約 4 0 0 0)を次の3 種類の固体培地にレブリカ 法により強りつける。

- ① C ▲培地
- ③ C L A 培地: C A 培地を加熱設置後、冷却して培地の温度が4 まてまで下がつてから200回/1になるようにリゾナームを括加した培地。

について頒称と比較した結果を第「後に示す。」 種類の個体培地上での生育はレブリカ法で始 りつけ、30℃で3日間培養を刊定した。 長中 生育網の+は簡の生育が観察されたものを、一 は生育が観察されなかつたものを示す。また長 中リゾナーム感受性は次のように試験した。す をわちに培地にて34時間30℃液体振量培養 した感を集層後、生租食塩水にて適当に希釈し て関体の腸病液をつくる。

との思浸液 / 0 * 細胞相当を借々系列の母庭の リゾテームを含有する C ▲ 特地に裏下装置し、 3 0 ℃ でよ日間培養する。 裏の生育がまつたく 留められない最小のリゾテーム最底を當のリゾ ナーム感受性値(最小生育風止最度)とした。

30でで1日間培養後、CA培地で生育し、CIA培地で生育しない菌をリンテーム感受性変異株として得る。MA培地で選校と同様化生育する自己栄養性でリンテームに対して感受性の変異株は試験した4000コロニーの中化ノノの機得られた。このノノの株中ノフ機が増生をする能力を有していた。コリネバタテリウオテン機構培地でも多量のエーグルのミンテリウム・グルチミタムエエタフのまかよびエエタフリカムエスのインを観像とする変異解跡も上記と同様に行って、プレビバクテリウム・フラブムエエタフょまを得た。

上記例示の変異株のMA塔地、CA培地、CA培地、CA培地、CA培地での生育なよびリゾテーム感受性度

第/表

国 	集		Ħ	リンゲーム感受性的	
	MA培地	CA培地	CLA 焙地	(MIC #8/#4)	
コリネノタテリウム・					
TNORDA		İ			
KY 9703	+	+	· -	100	
KY 9703	+	+	-	2 5	
ATCC /3032	+	+	+	\$00	
プレビバタナリウム・ アラブム		`			
XX 9733	_		_		
ATCC /#067		`	+	800	
ATUC 74067	*	•	•	200	

本発明の食生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無様化合物、その他の栄養素を適当に含む培地を与ば、通常エーダルタミン酸生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては薫器。 ブドウ糖、糖養をどの種質⇒よび 殷齢糖化液などが、健素薬としてはアンモニア、経験アンモニウム、複数アンモニウム、皮酸アンモニウム、

特朗昭54-122794(4)

適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例 /

グルコース #08/4、(NH4)280, 28/4、 Mg80.7H20 018/4, KH2PO. 058/4, E_HPO_ /F/A, FoSO_-7H_2O 2m/A, MnSO_-#8.20 2四/4、サイアミン塩酸塩 /四/8、フェ ノールレッド 104/4 かよびピオテン 389/4 あるいは / 00 μ8/8 の組成を有する培地を調製 し、pHを10に調整した後、30半ずつ300 **お客の 枝 付フラスコに入れ、ノノメででノメ** 分間加熱救援した。冷却後、別に加熱救援した **泉業液を48/4にたるように添加した。との** 培地に第3数に示した菌を接種しょりで伝統 培養を行つた。培養中培養液をPH ムよ~40 に保つため/ 3時間目と20時間目の3個風象 液を48/4になるように終加し、3.2時間で培 養を終了した。かくして培養液中に蓄積した五 グルチミン散量は、第4嵌に示す通りである。 培養放!1から個体を除去し、最適し、塩酸で

水酸化アンモニウム、タエン酸アンモニウム、 酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素 などの有機無模窒素化合物、ペプトン、肉エキ ス、コーンステーブリカーなどの天然栄養環ま どが、無機化合物としては頻酸第一カリ、燐酸 第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネンウム、塩化 マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸 マンガン、塩化マンガンなどが、その他の栄養 派としてはピオチン、サイブミンなどが用いら れる。

培養は扱量培養、通気操养培養をどの好気的 条件で行い、培養温度はユギー37℃とくに ユギー33℃が好選である。培養中は適当な中 和剤を用いてpBを6~9に調整するのが好ま しい。培養は1~3日間行えば培養液中に著量 のエーグルタミン酸が生成蓄積する。培養液か らのエーグルタミン酸の採取は、関体を除去し た上情液から、イオン交換樹脂による優麗者法、 機能品析法、特電点品析法をど、従来のエーグ ルタミン酸の製造にかいて常用される誘方法を

PB よるに調整し、冷却してレーグルタミン酸 の組結晶を得た。組結晶の量(9)を括弧内に ・示す。

第2表

i		レーグルチミン酸蓄積量 号/出			
個 株		EXTY 2 #8/8 EXTY 100 M			
		委加培地	"添加培地		
コリネ・タテリウム	· 7M3 37L				
EY97	0.5	2/(47)	R3(49)		
EYF7	05	/KS(/Q7)	140(104)		
ATCC	13032	20	az		
プレヒパタテリウ	ム・フラブム	- - (+)			
EY97	3 3	EF(43)	E#(&2)		
ATCC	14067	7.4	a/		

実施例 2

実施例/で用いた培地中グルコースを甘画店 需要(グルコースとして #08/8 相当量) に換え、加熱設置後の培地を PB 7.0 に再調整する 以外は実施例/と同様に行つた。培養液中に蓄 接した L-グルタミン設量を第3表に示す。

終し親

重 株	ユーダルタミン被害権1 (四ノビ)
コリネ・タテリウム・ダルタマクム	
KT9703	11.2
ET9703	116
ATCC/3082	0.3
プレビンタナリウム・フラブム	
KT9733	2.7
ATCC/#067	a.2

特許出願人(103)協和服静工業株式会社 代表者 高 田 弘

特開昭54-122794(5)

昭和54年3月32日 适

有 許 庁 長 官

1. 事件の表示

昭和53年特許團第2

2 発明の名称

L-グルタミン酸の製造法

3. 補正をする者

特許出顧人 〒100 事件との関係

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

名

(102) 協和服御工業株式会社

4. 補正の対象

明細盤の発明の詳細な問題が開かよび特許

5. 補正の内容

1) 明細書第6頁4行目の「および」を削除し 次の配載を加入する。

「およびプレヒバクテリウム・サンカロリテ イクム ATOO 14046」を加入する。

- 5) 明細書館 8 頁 1 8 行目の「 5 3 」の 後に 「およびプレヒバクテリウム・サツカロリテ イクムT321」を加入する。
- 6) 明細書祭10頁第1表を次の通りに訂正す

「コリネベクテリウム・グルタミクムエ 3 5 9 (後工研答託受理番号第 4 7 8 9 号、 HRRL 8-11433)、コリネベクテリウム。 グルタミクムまち27(飯工研客託受理番号 期 # 7 9 0 号、 WRRL B-11 434)、コリネ パクテリウム・リリウム ATCC 15990か ら誘導されたコリネパクテリウム・リリウム 〒322(微工研新託受理番号館#79/号、 NRRL 8-11435) . J

2) 明細書第4頁8行目の「HRRL 11273)」の 後に次の記載を加入する。

「かよびプレビベクテリウム・サッカロリ テイクス ATCC 14066から誘導されたプ レビバクテリウム・サフカロリティクム:1 3 2 1 (微工研客託受理番号館 4 7 9 2 号、 MRRL 8-11436)]

- 3) 明細書第8頁13行目の「および」を別録 し、何14行目の「05」の後に「エ359 かよびする27」を加入する。
- 4) 明細書第8頁16行目の「067」の後に

	・生		,	リンケー人の受性
富. 株	MA培施 CA培施 D			遊場才生育祖止 漢書
	■▲焙炮	□▲蛤地	ロエル始地	(MOC # /w)
コリネベクテリウム・グルクミクム				
7 559	+	+	±	400
T 527	+	+		200
XY 9.705	+	+	-	100
KT 9705	+	+	-	25
ATOC 15052	+	+	+	600
コリネ・バクテリウム・リリ ウム				
T 522	+	+	-	50
ATO0 15990	+	+	-	400
プレビベクテリウム・フラ ブム	ì			
KY 7785	+	+	-	50
A705 14867	+	+	+	800
プレビベタテリウム・テン カロリテイタム				
T 521	+	+	-	180
ATOC 14066 .	+	+	+	800
i	- 1	}		

/ .

特開昭54-122794(6)

7) 明細 第14頁第5要の後に次の「実施何 ³ 」を加入する。

「実施的3

使用菌株を解4要に示す菌株に替えて行う 以外は実施例(と同様に行つて第4後に示す 「貴の L"-グルタミン酸の蓄積を見た。

第 4 表

	L-グルタミン酸薬検査(PE/S)		
樹 . 休	ピオテン 2 #8 / 6 転加培地	ビオテン 180 FS/参数加 培地	
コリネベクテリウム・グルタミクム			
T 559	2.5	. 118	
T 527	1 0.5	130	
ATOO 13032	9.0	. 0.2	
コリネバクテリウム・リリウム			
T 522	20	100	
ATCO 15990	8.5	Q 1	
ブレビジクラリウム・サフカロリテイク ム			
T 321	1 0.5	1 1.0	
ATCC 14066	2.5	0.2	

农生物保管委託申請者受理委号第一写(通

許請求の範囲を別紙の通りに訂正する。

特許 勝求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してレーグルタミン酸を培地中に審徴させ、これを採取する方法において、リンテームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてエーグルタミン酸の生産が抑制されない関係を用いることを特徴とするエーグルタミン酸の製造法。
- (2) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リグテームに感受性を有し、 均地中に存在する過剰のピオテンによつても - グルタミン酸の生産が抑制されない性質を 有する微生物。
- (3) 監像生物がコリネベクテリウム・グルタミ クム、コリネバクテリウム・リリウム、ブレ ビベタテリウム・フラブムまたはブレビバタ テリウム・テフカロリテイクムに属する菌株 から選ばれる特許請求の範囲2の歌生物。
- (4) 眩暈生物がコリネベクテリウム・グルタミ

K Y 9 7 0 5 (做工研寄託受理委号部 12, BRRL 1 1271), 3 9 A A 9 テリウム・グルタミクムEI9705(数工 研 野 託 受 理 番 号 第 4 4 1 3 、 NRRL 1 1 2 7 2)、コリネベクテリウム・グルタミクムで 5 5 9 (後工研寄託受理委号第4749 、 HRRL 8-11433) . = 9 * × 9 7 9 9 4 . グルタミクムエ327(仮工研寄託受理番号 <u>第4790</u>、 HRRL B-11434)、コリネパ クテリウム・リリウムで522(食工研寄託 受職番号第4791 、 BRRL 8-7/435)、 プレビバクテリウム・フラブムET9785 (数工研寄託受查番号第4414、 MRRL 1 1 2 7 5) <u>およびプレ</u>ピパクテリウム・サ ツカロリティダム (仮工研書託受理番号第 学術人 #792 、 MRBL B-11436)から過ばれる 特許請求の範囲 3の 数生物。